

LAWYERS' AND MERCHANTS' TRANSLATION BUREAU, INC.

Legal, Financial, Scientific, Technical and Patent Translations

11 BROADWAY

NEW YORK, NY 10004

Part of
#30



Certificate of Accuracy

TRANSLATION

From German into English

German Application

No. 197 41 929.1

STATE OF NEW YORK } s.s. :
COUNTY OF NEW YORK

On this day personally appeared before me
who, after being duly sworn, deposes and states: Elisabeth A. Lucas

That he is a translator of the **German** and English languages by profession and
as such connected with the **LAWYERS' & MERCHANTS' TRANSLATION**
BUREAU;

That he is thoroughly conversant with these languages;

That he has carefully made the attached translation from the original document
written in the **German** language; and

That the attached translation is a true and correct English version of such original,
to the best of his knowledge and belief.

SUBSCRIBED AND SWORN TO BEFORE ME
THIS

SEP 18 2002

Susan Tapley
Notary Public, State of New York
No. 01TA4999804
Qualified in Queens County
Certificate filed in New York County
and Kings County
Commission Expires July 27, 2005

September 23, 1997

New German Patent Application

"Costimulating polypeptide of T cells, monoclonal antibodies, and the preparation and use thereof"

Applicant: Federal Republic of Germany, ultimately represented by Prof. R. Kurth

Our reference: 169-1

**Costimulating polypeptide of T cells, monoclonal antibodies,
and the preparation and use thereof**

The invention relates to a polypeptide (8F4 molecule) having the biological activity of costimulating T cells. The invention further relates to monoclonal antibodies against the 8F4 molecule and hybridoma cells which produce the monoclonal antibodies. The invention additionally relates to the use of substances which inhibit the biological activity of the polypeptide 8F4 according to the invention, in particular monoclonal antibodies, natural or synthetic ligands, agonists or antagonists, as pharmaceuticals. In particular, the invention relates to the use of these substances for the prevention or therapy of disorders in which the immune system is involved, in particular for the treatment of autoimmune diseases and for the prevention of rejection reactions with organ transplants. The invention additionally relates to the use of the 8F4 molecule or of cells which contain the 8F4 molecule as pharmaceuticals, in particular for the prevention or therapy of disorders in which the immune system is involved, in particular for the treatment of cancers, Aids, asthmatic disorders or chronic viral diseases

such as HCV or HBV infections. The invention further relates to the use of substances which specifically recognize the polypeptide according to the invention, in particular monoclonal antibodies, natural or synthetic ligands, agonists or antagonists, for the diagnosis of disorders in which the immune system is involved. In particular, the invention relates to diagnosis by means of an ELISA detection, a flow cytometry or a Western blot, a radioimmunological detection, a nephelometry or a histochemical staining.

T lymphocytes recognize their antigen, which is presented by "antigen-presenting cells", for example dendritic cells, B cells and macrophages, through their T-cell receptor. Recognition of the antigen by the T-cell receptor alone is, however, in most cases insufficient for adequate activation of T lymphocytes. The latter makes additional simultaneous stimulation (also called "costimulation" hereinafter) by other receptor molecules on the surface of the T lymphocytes necessary. One of these receptor molecules is the so-called CD28 receptor which is stimulated by the costimulating molecule B7. If these "costimulatory" molecules, for example CD28, are effective, then the activation of the T cell reaches an adequate level after recognition of the antigen by the T-cell receptor. After such a complete activation, the T cell expresses additional molecules, for example CD25, CD69, CD71, on the surface and synthesizes numerous cytokines, for example IL-2

and IFN- γ , which function as messengers. Both these additional surface molecules and the cytokines serve for the T cell to exchange information with other cells in the immune system. The activated T cells direct the entire antigen-specific immune defenses through the additional surface molecules and the cytokines. Both the generation of cytotoxic cells ("killer cells") and the generation of antigen-specific antibodies by B cells is controlled in this way. Cytotoxic cells, as well as the specifically formed antibodies, eliminate viral or bacterial pathogens which enter the body. In some cases, however, the immune response goes too far, and the immune system is directed against the body's own cells. This leads to the occurrence of "autoimmune diseases", for example to rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, Sjögren's syndrome, ulcerative colitis inter alia. One of the essential sites of cooperation between antigen-activated T cells and other cells of the immune system are the secondary lymphatic organs, including the tonsils. This is where the T lymphocytes are activated by the antigen presented by dendritic cells, and this is where T lymphocytes interact with B cells. Through this interaction, B cells secrete, after several intermediate stages of differentiation, antigen-specific antibodies of the IgM and IgG types.

The costimulatory molecule which has been characterized best and is among the most effective to date is the CD28 surface molecule (called CD28 receptor or CD28

hereinafter) which is constitutively expressed on a large fraction of T cells. Costimulation by CD28 *in vitro* leads, after recognition of the antigen by the T-cell receptor, to a very large increase in cytokine secretion, for example of IL-2 and IFN- γ , and to a marked up-regulation of the expression of cell surface molecules such as CD25, CD69, CD71, which are necessary for interaction of T cells with other immune cells, for example B lymphocytes; cf. Chambers and Allison, *Current Opinion in Immunology* 9 (1997), 396-404. Costimulation via the CD28 receptor can also markedly increase the proliferation of T lymphocytes. In addition, costimulation via the CD28 receptor optimizes the T-cell control of B-lymphocyte function so that there is increased secretion of antibodies.

If the function of the CD28 receptor is abolished, there is a drastic loss of function in the immune defenses. This has been shown by means of a transgenic mouse in which the CD28 gene was destroyed by homologous recombination (a so-called "CD28 knock-out"). The destruction in this way of activation of the antigen-specific T cells leads to lack of costimulation. This in turn leads to a disturbance of T-cell function, that is to say to a reduced proliferation of T cells and to a drastically reduced synthesis of various cytokines. The lack of costimulation eventually leads to a reduced function of the antigen-specific immune defenses. Thus, *inter alia*, the formation of antigen-specific IgG1 and IgG2 antibodies by B lymphocytes is reduced to 10% of the

normal level through the lack of CD28; cf. Shahinian et al., *Science* 262 (1993), 609-612; Lucas et al. *Journal of Immunology* 154 (1995), 5757-5768.

It is also possible *in vitro* to prevent the Aids virus entering T lymphocytes by costimulation by CD28; cf. Riley et al., *Journal of Immunology* 158 (1997), 5545-5553. Corresponding experiments *in vivo* have not yet been carried out. It is known that CD28 switches on many cytokine genes which may lead to considerable side effects *in vivo*. Blockade of CD28 receptors by a soluble CTLA-4 immunoglobulin molecule has been employed successfully in a monkey model to prevent the rejection of transplanted kidneys. In this case, CTLA-4 had been employed in combination with an antibody against the CD40 ligand molecule; cf. Kirk et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 8789-8794. However, blockade of CD28 receptors affects all T lymphocytes and not just those already activated because CD28 is constitutively expressed on T lymphocytes.

There is thus a need for a costimulating surface molecule which is expressed only on activated T lymphocytes. The invention is therefore based on the object of providing a surface molecule on activated T cells which has a strong costimulatory effect on central functions of T lymphocytes. Another object of the invention is to provide substances, for example monoclonal antibodies against the costimulatory

surface molecule, natural or synthetic ligands, agonists or antagonists of the surface molecule.

In a first embodiment, the invention relates to a polypeptide having the biological activity of costimulation of T cells, characterized in that a) the polypeptide occurs on activated CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes but not on resting or activated B cells, granulocytes, monocytes, NK cells (natural killer cells) or dendritic cells, and b) the polypeptide is a dimer, the polypeptide having a molecular weight of about 55 to 60 kDa (kilodalton) determined in a non-reducing sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and the two polypeptide chains of the polypeptide having a molecular weight of about 27 kDa and about 29 kDa measured in a reducing SDS-PAGE.

The polypeptide according to the invention (also called 8F4 molecule or 8F4 hereinafter) is expressed only after activation of the T lymphocytes, specifically both on CD4⁺ and on CD8⁺ T cells. In a non-reducing SDS-PAGE, the 8F4 molecule has a molecular weight between about 55 and 60 kDa (kilodalton). The 8F4 molecule is composed of two peptide chains, and the two peptide chains have a molecular weight of about 27 and about 29 kDa in a reducing SDS-PAGE. The 8F4 antigen can be unambiguously detected histologically on activated T lymphocytes in the lymphatic tissue of the tonsils and lymph nodes, especially in the germinal centers, the site of interaction of T lymphocytes and B lymphocytes in the generation of antibodies. Tonsillar T cells isolated

ex vivo are about 50-80% positive for the 8F4 antigen and show signs of advanced activation. The 8F4 molecule is not detectable on resting or activated B cells, granulocytes, monocytes, NK cells and dendritic cells.

An important biological activity of the 8F4 molecule is its costimulating activity on T lymphocytes. The costimulating activity can be determined by the method of Linsley et al., *Journal of Experimental Medicine* 176 (1992), 1595-604. The costimulating activity of the 8F4 molecule resembles the costimulating activity of the CD28 molecule, which has been identified as the central enhancement element of antigen recognition by the immune system. The 8F4 molecule differs in many aspects from CD28, however. Thus, expression of the 8F4 molecule on the surface of the T cells requires induction, whereas CD28 is constitutively expressed. There are also distinct differences detectable in the function: costimulation by CD28 leads to overexpression of numerous lymphokines, inter alia of interleukin-2 (IL-2). Costimulation by 8F4 also leads to enhanced secretion of lymphokines, but not of IL-2. The costimulatory activity of the 8F4 molecule thus differs from the activity of the CD28 molecule. Since stimulation by 8F4 does not switch on all cytokine genes, costimulation by 8F4 in vivo is advantageous, for example compared with costimulation via the CD28 receptor. Moreover, the induction, the expression, the site of expression and the function of the 8F4 molecule

differ from all other known molecules with costimulatory activity.

The 8F4 molecule according to the invention is a novel surface molecule on activated T cells which has a strong costimulatory effect on central functions of T lymphocytes. Expression *in vivo* indicates inter alia an essential involvement of the 8F4 molecule in the cooperation of T cells with other cells of the immune system such as B cells or dendritic cells within the humoral and cellular immune defenses against viruses and bacteria.

After expression, the 8F4 molecule has *in vitro* a strong costimulatory effect on various functions of T lymphocytes:

1. Marked enhancement of the proliferation of T lymphocytes.
2. Marked enhancement of the synthesis of certain cytokines by T lymphocytes.
3. Greatly increased expression of control molecules, for example surface molecules and cytokines, on and in T lymphocytes.
4. Marked improvement in T-cell-induced antibody formation (IgM and IgG) by B cells.

In a second embodiment, the invention relates to monoclonal antibodies against the 8F4 molecule. The monoclonal antibodies according to the invention can be prepared in a conventional way by the method described by Milstein and Köhler, *Nature* 256 (1975), 495-497. In

particular, the monoclonal antibodies according to the invention can be prepared by immunizing mice with T cells which have been activated *in vitro* with phorbol myristate acetate (PMA) and ionomycin ("2-signal system") for 24 h. The spleen cells of the immunized mice are fused with myeloma cells. 8F4-specific monoclonal antibodies are identified by their recognition of 2-signal-activated but not resting T lymphocytes. Moreover 8F4-specific antibodies do not stain T cells stimulated with one signal (either PMA or ionomycin) in a detection method carried out in a conventional way. 8F4-specific antibodies produce a typical staining pattern of tonsillar T cells and recognize an antigen of about 55 to 60 kDa in a non-reducing SDS-PAGE and of about 27 kDa and about 29 kDa in a reducing SDS-PAGE on activated T lymphocytes.

In another embodiment, the invention relates to hybridoma cells which produce the monoclonal antibodies according to the invention.

In another embodiment, the invention relates to the use of substances which inhibit the biological activity of the polypeptide 8F4 according to the invention as pharmaceuticals. The use of the monoclonal antibodies according to the invention, natural or synthetic ligands, agonists or antagonists of the 8F4 molecule is particularly preferred. These substances can be used as pharmaceuticals for the prevention or therapy of disorders in which the immune system is involved, in particular for the treatment

or autoimmune diseases or for prevention of rejection reactions in organ transplants. Blockade of the interaction of the 8F4 antigen with its receptor improves, for example, the prevention of organ rejection because such a blockade affects only previously activated T lymphocytes.

Another embodiment of the invention relates to the use of the polypeptide according to the invention as pharmaceutical. The polypeptide according to the invention can be used in particular for the prevention or therapy of disorders in which the immune system is involved, in particular for the treatment of cancers, AIDS, asthmatic disorders or chronic viral diseases such as HCV or HBV infections.

The polypeptide according to the invention can likewise be introduced into cells in a conventional way so that these cells for example constitutively express the polypeptide. For example, the nucleic acid sequence encoding the polypeptide or a vector comprising the nucleic acid sequencing encoding the polypeptide, for example the cDNA or genomic DNA, promoters, enhancers and other elements required for expression of the nucleic acid sequence can be inserted into a cell. The polypeptide according to the invention can also be introduced for example by means of liposomes into cells which then form the polypeptide on their cell surface. These cells can be used as pharmaceuticals according to the invention, in particular for restoring dysregulation of the human immune system, as

occurs within the framework of numerous chronic infectious diseases, for example within the framework of AIDS, asthmatic disorders or in chronic viral hepatitis (for example HCV, HBV), or for stimulating the immune system *in vitro* or *in vivo* such as, for example, be used for the therapy of cancers.

In another embodiment, substances which specifically recognize the polypeptide according to the invention are used for diagnosing disorders in which the immune system is involved, the substances embracing in particular a monoclonal antibody, natural or synthetic ligands, agonists or antagonists. It is possible to use for the diagnosis for example an ELISA detection, flow cytometry, Western blot, radioimmunoassay, nephelometry or a histochemical staining. The implementation of these detections is known to those skilled in the art.

The figures serve to illustrate the invention:

Fig. 1 shows the result of an immunoprecipitation of the 8F4 antigen from activated human T cells. (a) Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE; 12% polyacrylamide gel (PAA gel)) reducing, (b) SDS-PAGE (10% PAA gel) non-reducing. The conditions for elution of the antigen from the 8F4 matrix are indicated. "SDS" means sodium dodecyl sulphate; "DTT" means dithiothreitol, "Mr" means molecular weight and "kDa" means kilodalton.

Fig. 2a shows the result of a flow cytometry after induction of the 8F4 antigen on CD4⁺ T cells. The activation

time for the T cells is indicated in parentheses. "PMA" means phorbol myristate acetate; "PHA" means phytohaemagglutinin; "OKT3" is a monoclonal antibody against CD3; "MLR" means mixed lymphocyte reaction; "mAK 9.3" is a monoclonal antibody against CD28; "SEB" means staphylococcal enterotoxin B.

Fig. 2b shows the result for the kinetics of induction of the 8F4 antigen on CD4⁺ T cells after activation with PMA and ionomycin in a flow cytometry. The immunofluorescence (log) is plotted against the cell count.

Fig. 3 shows the result of a flow cytometry for identifying molecules which are involved in the induction of 8F4 in the mixed lymphocyte reaction. "bio" means biotinylated antibody.

Fig. 4 shows the result of a histochemical investigation for localization of 8F4-positive cells in the tonsil.

Fig. 5 shows the result of an expression analysis of 8F4 on T and B cells from human tonsils in a flow cytometry. "bioPE" means biotinylated antibody and streptavidin-phycoerythrin secondary reagent.

Fig. 6 shows the coexpression of the 8F4 molecule with other activation markers (CD69, CD45) in a flow cytometry.

Fig. 7 shows diagrammatically the enhanced expression of activation molecules on T lymphocytes after costimulation by 8F4. Open circles (O) represent 8F4

antibodies; triangles (♦) represent nonspecific antibodies of the same isotype; filled circles (●) represent anti-CD28 antibodies-9.3.

Fig. 8 shows a diagrammatic comparison of the costimulating effect of 8F4 with the costimulating effect of CD28. "mAk" means monoclonal antibodies; "ATAC" means "activation induced T-cell-derived and chemokine-related"; "cpm" means radioactive disintegrations per minute.

Fig. 9 shows diagrammatically the enhancement of the synthesis of the antibodies of the IgM and IgG types by B cells after costimulation of T cells. "ng" means nanogram; "ml" means milliliter; "mAk" means monoclonal antibody.

Fig. 10 shows diagrammatically the prevention of the activation-induced apoptosis of peripheral T cells after costimulation by 8F4.

The following examples illustrate the invention and are not to be understood restrictively.

Example 1: Generation of the 8F4 antibody

Balb/c mice were immunized with human T cells which had previously been activated for 24 h with 33 ng/ml of the phorbol ester phorbol myristate acetate (PMA) (Sigma, Deisenhofen) and with 200 ng/ml of the Ca^{2+} ionophores ionomycin (Sigma, Deisenhofen) (so-called "2-signal activation"). After boosting three times, the spleen cells of the mice were fused with the myeloma P3X63Ag8.653 (ATCC No. CRL-1580), and antibody-secreting hybridomas were generated by standard methods; cf. Peters and Baumgarten,

Monoclonal Antibodies, Springer, Heidelberg, 1992. The resulting antibodies were screened for activated versus resting T cells in flow cytometry. Activated ("2-signal activation") and resting T cells were incubated with the hybridoma supernatant and then labeled with a fluorescence-labeled secondary antibody; cf. Shapiro, Practical Flow Cytometry, Wiley-Liss, New York, 1995. Only the antibodies which recognize molecules which were induced exclusively by PMA and the Ca^{2+} ionophores ionomycin on the T-cell surface, but not by one of the agents alone ("2-signal molecules"), were selected for further purification. The resulting antibodies were investigated in flow cytometry for similarity to or difference from known antibodies against activation molecules (cf. Table 1) on T cells. The criteria for this were, besides the above-mentioned "2-signal dependence", the kinetics of induction on stimulated T cells and the expression on various cell lines.

Example 2: Immunoprecipitation of the 8F4 antigen

Surface molecules from activated human T cells were iodinated with ^{125}I by standard methods and immunoprecipitated with the antibody 8F4 by standard methods; cf. Goding, Monoclonal Antibodies: Principle and Practice, Academic Press, London, 1996. The antibody for the immunoprecipitation was coupled by the method of Schneider et al., *Journal of Biological Chemistry* 257 (1982), 10766-10769, to protein G (Pharmacia, Freiburg) (8F4 matrix). The matrix was washed as described by Schneider et al., see

above. The immunoprecipitated 8F4 molecule was analyzed for its molecular mass in an SDS-PAGE (non-reduced and reduced) in a conventional way; Goding, see above.

Example 3: Flow cytometry

The 8F4-carrying T cells were analyzed in flow cytometry by standard methods; cf. Shapiro, Practical Flow Cytometry, Wiley-Liss, New York, 1995.

Exemplary embodiment 3.1: Flow cytometry after induction of the 8F4 antigen on CD4⁺ T cells.

CD4⁺ T cells from peripheral blood were stimulated with various agents in a conventional way, and investigated for expression of the 8F4 molecule in flow cytometry by a conventional method. The activation time for the T cells was between 24 hours and 144 hours with the various agents. Modes of activation: phorbol myristate acetate (PMA; 33 ng/ml), ionomycin (200 ng/ml), phytohaemagglutinin (PHA 1.5 mg/ml), OKT3 (monoclonal antibody against CD3), mixed lymphocyte reaction (MLR, between 50,000 CD4⁺ T cells and 100,000 B cells), mAk 9.3 (monoclonal antibody against CD28), staphylococcal enterotoxin B (SEB, 0.1 ng/ml). Analysis revealed that various stimuli are suitable for inducing the 8F4 molecule on T cells, but the expression density differs. The most potent stimuli, besides the highly active pharmacological agents PMA and ionomycin, are those which represent a costimulatory situation such as, for example, accessory cells in the MLR or the costimulating mAk 9.3.

Exemplary embodiment 3.2: Kinetics of induction of the 8F4 antigen on CD4⁺ T cells after activation with PMA and ionomycin.

CD4⁺ T cells from peripheral blood were stimulated with PMA (33 ng/ml) and ionomycin (200 ng/ml) in a conventional way and investigated after 0, 4, 8, 12, 24 and 48 hours for expression of the 8F4 molecule by flow cytometry in a conventional way. The molecule is detectable on the surface after only four hours, and thus belongs to the class of relatively early activation antigens. There is still good expression of the antigen even after 48 hours.

Exemplary embodiment 3.3: Flow cytometry to identify molecules which are involved in the induction of 8F4 in the "mixed lymphocyte reaction".

50,000 CD4⁺ T cells from peripheral blood were cocultivated with 100,000 allogeneic tonsillar B cells for 6 days (37°C, 5.2% CO₂, 200 µl of RPMI 1640 with 10% FCS in 96-well round-bottom plates) and then investigated for expression of the 8F4 molecule in flow cytometry. At the start of cultivation, various antibodies (anti-CD80, anti-CD86, anti-MHCII; all 10 mg/ml) were added to the culture in order to examine the dependence of 8F4 induction on these molecules. Expression of 8F4 can be blocked only by blockade of the CD86/CD28 interaction, but not by blockade of CD80. The blockade effect in this case is even stronger than the blockade of MHCII (positive control).

Exemplary embodiment 3.4: Expression of 8F4 on T and B cells from human tonsils.

B cells and T cells from tonsillar tissue from various sources were purified in a conventional way and investigated by flow cytometry for expression of the 8F4 molecule. Whereas the signal was not unambiguously significant on B cells, there was expression of the 8F4 molecule in varying density by about 50-80% of tonsillar T cells. It is possible in this case to identify two populations differing in the level of fluorescence (8F4 high and low, respectively), and differing in expression on the various tonsils. Thus, for example, tonsils shows a pronounced 8F4 low population and other tonsils shows a pronounced 8F4 high population.

Exemplary embodiment 3.5: Coexpression of the 8F4 molecule with other activation markers.

T cells purified from human tonsils were analyzed in 2-colour flow cytometry for coexpression of the 8F4 molecule with other activation markers. In tonsils, 8F4 is coexpressed with CD69 as well as with variants of the CD45 molecule. In this case, the 8F4 high cells are unambiguously correlated with a CD45RO expression, while the 8F4-negative cells carry the phenotype CD45RA. CD45RA is mainly expressed by so-called "naïve" T cells, whereas CD45RO is associated with an effector cell function. The 8F4⁺ cells are thus mainly "mature" T cells. CD45RO and CD45RA are isoforms of CD45.

Example 4: Localization of 8F4-positive cells in the tonsil

Tonsillar tissue in frozen sections was stained with the 8F4 antibody in the APAAP technique (alkaline phosphatase-anti-alkaline phosphatase) by standard methods. 8F4⁺ cells were found preferentially in the germinal center of the tonsils, but also in part in the T-cell zone of the tonsils.

Example 5: Costimulation of T lymphocytes

96-well plates were coated with a goat anti-mouse Ig antibody (20 µg/ml), washed, and loaded with the anti-CD3 monoclonal antibody OKT3 (various dilutions of an ascites) and the 8F4 antibody according to the invention (2 mg/ml). The OKM1 antibody or the 2A11 antibody (both 2 mg/ml) were used as isotype control.

Exemplary embodiment 5.1: Enhanced expression of activation molecules on T lymphocytes after costimulation by 8F4.

Purified CD4⁺ T cells from peripheral blood were activated with various concentrations of the monoclonal antibody OKT3 and, at the same time, costimulated with the 8F4 antibody or a nonspecific antibody of the same isotype. As comparison, costimulation was carried out with the anti-CD28 antibody-9.3, one of the strongest known costimulatory antibodies. Even with optimal stimulation by CD3, a costimulatory effect is still to be seen both with the mAk 8F4 and with the mAk 9.3. In the suboptimal OKT3 region, that is to say the region in which complete T-cell activation cannot be achieved without costimulation, both

antibodies are able to increase the expression of other activation antigens by a factor of 4 to 100, and the effect of the anti-CD28 antibody is still visible even at very high OKT3 dilutions. This is attributable to the fact that with very weak OKT3 stimulation the 8F4 antigen is no longer brought to the cell surface and thus cannot be crosslinked by the mAk 8F4 either.

Exemplary embodiment 5.2: Comparison of the costimulating effect of 8F4 with the costimulating effect of CD28.

Purified CD8⁺ T cells were stimulated with a suboptimal concentration of the monoclonal antibody OKT3 for 51 h. The costimulators employed were antibody 8F4, antibody 9.3 (anti-CD28) and isotype controls (2 mg/ml each). After completion of the stimulation time, the T-cell proliferation rate was determined by ³H-thymidine incorporation. In parallel cultures, the supernatant was removed and the concentration of the cytokines ATAC/lymphotactin and IL-2 was determined. 8F4 and CD28 differ greatly from one another in relation to IL-2 synthesis. CD28 costimulation leads, as also described in the prior art (Chambers and Allison, *Current Opinion in Immunology* 9 (1997), 396-404), to very extensive IL-2 secretion. By contrast, IL-2 production with 8F4 is below the detection limit. However, proliferation is comparable in the two mixtures, and thus the autocrine growth of the T cells must be attributed to other factors on costimulation of 8F4. The two antibodies also differ

scarcely at all in the costimulatory effect in relation to secretion of the lymphokine ATAC.

Example 6: Determination of the immunoglobulins synthesized by B cells after interaction with 8F4-costimulated T cells

96-well plates were coated with a goat anti-mouse Ig antibody (20 mg/ml), and loaded with the anti-CD3 monoclonal antibody OKT 3 (1:500 to 1:80,000 ascites) and the 8F4 antibody according to the invention (2 mg/ml). The OKM1 antibody or the 2A11 antibody was used as isotype control. In some experiments, a costimulation was carried out with a CD28-specific antibody ("9.3") for comparison; cf. Hara et al., *Journal of Experimental Medicine* 161 (1985), 1513-1524. 50,000 purified (Magnetobeads, Dynal, Hamburg) CD4⁺ T cells (>95% purity) from peripheral blood and 25,000 allogenic tonsillar B cells (negative selection by T-cell rosetting with sheep erythrocytes, 96% purity) were pipetted into each well of the culture plates pretreated in this way, and cocultivated for 8 days. After this period, the supernatant was removed and analyzed for the concentration of secreted immunoglobulins of the IgM and IgG types in an ELISA in a conventional way; cf. Nishioka and Lipsky, *Journal of Immunology* 153 (1994), 1027-1036.

Exemplary embodiment 6.1: Enhancement of the synthesis of antibodies of the IgM and IgG types by the B cells after costimulation of T cells.

Purified CD4⁺ T cells from peripheral blood were cocultivated with allogeneic B cells from tonsils for 8 days

in a conventional way. With suboptimal stimulation of the T cells with the OKT3 antibody, the costimulation of the T cells by 8F4 enhances the secretion of IgM and IgG immunoglobulins by a factor of 40.

Example 7: Prevention of the activation-induced apoptosis of peripheral T cells after costimulation by 8F4.

Peripheral T cells (purified by nylon wool adherence in a conventional way), were stimulated with PHA (1.5 mg/ml) for 20 h and cultivated with IL-2 for 6 days. The cells were then restimulated by OKT3 with and without costimulation by mAk 8F4 (2 mg/ml). The apoptosis was determined by staining the DNA with propidium iodide in flow cytometry (FACS). With suboptimal stimulation via the T-cell receptor complex, costimulation by 8F4 can reduce the proportion of apoptotic cells by a factor of 4.

Table 1:

Table 1 summarizes the antibodies used (clone), their source of origin (source), the specificity for their particular antigen (specificity) and, where appropriate, their labeling (label).

| Speci- ficity | Label | Isotype | Clone | Source |
|--------------------------|--------------|----------------|--------------|---------------------------------|
| CD3 | Cy-Chrome | IgG1 | UCHT1 | Pharmingen, Hamburg |
| CD3 | - | IgG2a | OKT3 | ATCC CRL-8001 |
| CD11b | - | IgG2b | OKM1 | ATCC CRL-8026 |
| CD25 | FITC | IgG2a | B1.49.9 | Immunotech, Hamburg |
| CD28 | - | IgG2a | 9.3 | Immunex Corp., Seattle |
| CD45RA | Cy-Chrome | IgG2b | HI100 | Pharmingen, Hamburg |
| CD45RO | FITC | IgG2a | UCHL1 | Immunotech, Hamburg |
| CD69 | FITC | IgG1 | FN50 | Pharmingen, Hamburg |
| CD80 | - | IgG1 | L307.4 | Becton Dickinson, Heidelberg |
| CD86 | - | IgG2b | IT2.2 | Pharmingen, Hamburg |
| CD154 | FITC | IgG1 | TRAP-1 | Hybridoma ¹ |
| MHCII | - | IgG2a | L243 | ATCC HB-55 |
| 8F4 | - | IgG1 | 8F4 | Hybridoma ¹ |
| 8F4 | Biotin | IgG1 | 8F4 | Hybridoma ¹ |
| Isotype IgG1 | - | IgG1 | 2A11 | Hybridoma ^{1,2} |
| Isotype IgG1 | FITC | IgG1 | 2A11 | Hybridoma ^{1,2} |
| Isotype IgG1 | Biotin | IgG1 | ASA-1 | Hybridoma ¹ |

- ¹ The hybridoma cell line was generated in a conventional way, and the antibody was purified and labeled where appropriate.
- ² Directed against a synthetic peptide

The antisera and secondary reagents used in the examples were purchased from: goat anti-mouse Ig, FITC conjugated, from Jackson Immuno Research Lab., USA; Streptavidin, PE-conjugated, from Jackson Immuno Research Lab., USA; rabbit anti-mouse Ig fraction, from Sigma, Deisenhofen.

Patent claims

1. A polypeptide having the biological activity of costimulation of T cells, characterized in that

a) the polypeptide occurs on activated CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes but not on resting or activated B cells, granulocytes, monocytes, NK cells or dendritic cells, and

b) the polypeptide is a dimer, the polypeptide having a molecular weight of about 55 to 60 kDa determined in a non-reducing sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, and the two polypeptide chains of the polypeptide having a molecular weight of about 27 kDa and about 29 kDa measured in a reducing sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis

2. Monoclonal antibody which specifically recognizes the polypeptide according to Claim 1.

3. Monoclonal antibody which specifically recognizes the polypeptide according to Claim 1, characterized in that B cells of mice which are immunized with human T lymphocytes activated [lacuna] PMA and the Ca²⁺ ionophores ionomycin are fused with a myeloma cell line to give an antibody-secreting hybridoma, and the monoclonal antibodies are purified in flow cytometry for 2-signal molecule-activated against resting T cells.

4. Hybridoma cell which generates the monoclonal antibody according to Claim 2 or 3.

5. Use of substances which inhibit the biological activity of the polypeptide according to Claim 1 as pharmaceuticals.

6. Use according to Claim 5, where the substances comprise a monoclonal antibody, natural or synthetic ligands, agonists or antagonists.

7. Use of substances which inhibit the biological activity of the polypeptide according to Claim 1 for the production of a pharmaceutical for the treatment of autoimmune diseases or for the prevention of rejection reactions in organ transplants.

8. Use of the polypeptide according to Claim 1 as pharmaceutical.

9. Use of the polypeptide according to Claim 1 for the production of pharmaceuticals for the treatment of cancers, Aids, asthmatic disorders or chronic viral diseases such as HCV or HBV infections.

10. Use of cells comprising the polypeptide according to Claim 1 as pharmaceuticals.

11. Use of cells according to Claim 10 for the production of a pharmaceutical for the treatment of cancers, Aids, asthmatic disorders or chronic viral diseases such as HCV or HBV infections.

12. Use of substances which specifically recognize the polypeptide according to Claim 1 for the diagnosis of disorders in which the immune system is involved.

13. Use according to Claim 12, where the substances comprise a monoclonal antibody, natural or synthetic ligands, agonists or antagonists.

14. Use according to Claim 12 or 13, where an ELISA detection, flow cytometry, Western blot, radioimmunoassay, nephelometry or a histochemical staining is used for the diagnosis.

Abstract

The invention relates to a polypeptide (8F4 molecule) having the biological activity of costimulating T cells. The invention further relates to monoclonal antibodies against the 8F4 molecule and hybridoma cells which produce the monoclonal antibodies. The invention additionally relates to the use of substances which inhibit the biological activity of the polypeptide 8F4 according to the invention, in particular monoclonal antibodies, natural or synthetic ligands, agonists or antagonists, as pharmaceuticals, in particular for the prevention or therapy of disorders in which the immune system is involved. The invention additionally relates to the use of the 8F4 molecule or of cells which contain the 8F4 molecule as pharmaceuticals, in particular for the prevention or therapy of disorders in which the immune system is involved. The invention further relates to the use of substances which specifically recognize the polypeptide according to the invention, in particular monoclonal antibodies, natural or synthetic ligands, agonists or antagonists, for the diagnosis of disorders in which the immune system is involved.

23. September 1997

Neue Deutsche Patentanmeldung

"Ko-stimulierendes Polypeptid von T-Zellen, monoklonale Antikörper sowie die Herstellung und deren Verwendung"

Anmelder: Bundesrepublik Deutschland, letztvertreten durch Prof. Dr. R. Kurth

Unser Zeichen: 169-1

DOC B
178ps

Ko-stimulierendes Polypeptid von T-Zellen, monoklonale Antikörper sowie die Herstellung und deren Verwendung

Die Erfindung betrifft ein Polypeptid (8F4-Molekül) mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen. Weiterhin betrifft die Erfindung monoklonale Antikörper gegen das 8F4-Molekül und Hybridomzellen, die die monoklonalen Antikörper herstellen. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung von Substanzen, die die biologische Aktivität des erfindungsgemäßen Polypeptids 8F4 hemmen, insbesondere monoklonale Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten, als Arzneimittel. Insbesondere betrifft die Erfindung die Verwendung dieser Substanzen zur Vorbeugung oder Therapie von Erkrankungen an denen das Immunsystem beteiligt ist, insbesondere zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten und zur Verhinderung der Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung des 8F4-Moleküls oder von Zellen, die das 8F4-Molekül enthalten, als Arzneimittel, insbesondere zur Vorbeugung oder Therapie von Erkrankungen an denen das Immunsystem beteiligt ist, insbesondere zur Behandlung von Krebserkrankungen, Aids, Asthmaerkrankungen oder chronischen viralen Erkrankungen wie HCV- oder HBV-Infektionen. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung von Substanzen, die das erfindungsgemäße Polypeptid spezifisch erkennen, insbesondere monoklonale Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten, zur Diagnose von Erkrankungen, an denen das Immunsystem beteiligt ist. Insbesondere betrifft die Erfindung die Diagnose mittels eines ELISA-Nachweises, einer Durchflußzytometrie, eines Western Blot, eines Radioimmunnachweises, einer Nephelometrie oder einer histochemischen Anfärbung.

T-Lymphozyten erkennen ihr Antigen, das von "Antigen-präsentierenden Zellen", z.B. dendritischen Zellen, B-Zellen und Makrophagen, dargeboten wird, durch ihren T-Zell-Rezeptor. Die Erkennung des Antigens durch den T-Zell-Rezeptor alleine aber reicht in den meisten Fällen nicht aus, um T-Lymphozyten ausreichend zu aktivieren. Hierzu bedarf es der zusätzlichen, gleichzeitigen Stimulation (nachfolgend auch "Ko-Stimulation" genannt) durch andere

B₂

Rezeptormoleküle auf der Oberfläche der T-Lymphozyten. Eines dieser Rezeptormoleküle ist der sogenannte CD28-Rezeptor, der durch das ko-stimulierende Molekül B7 stimuliert wird. Werden diese "ko-stimulatorischen" Moleküle, z.B. CD28, wirksam, so erreicht die Aktivierung der T-Zellen nach der Erkennung des Antigens durch den T-Zell-Rezeptor ein ausreichendes Niveau. Nach einer solchen vollständigen Aktivierung exprimiert die T-Zelle zusätzliche Moleküle, z.B. CD25, CD69, CD71, auf der Oberfläche und synthetisiert zahlreiche Zytokine, z.B. IL-2 und IFN- γ , welche die Funktion von Botenstoffen haben. Sowohl diese zusätzlichen Oberflächenmoleküle wie auch die Zytokine dienen dem Informationsaustausch der T-Zelle mit anderen Zellen des Immunsystems. Durch die zusätzlichen Oberflächenmoleküle und die Zytokine lenken die aktivierten T-Zellen die gesamte Antigen-spezifische Immunabwehr. Auf diese Weise wird sowohl die Generierung von zytotoxischen Zellen ("Killerzellen") wie auch die Generierung von Antigen-spezifischen Antikörpern durch B-Zellen gesteuert. Zytotoxische Zellen wie auch die spezifisch gebildeten Antikörper eliminieren virale oder bakterielle Erreger, welche in den Körper eindringen. In einigen Fällen kommt es jedoch zu einem Überschießen der Immunreaktion und das Immunsystem richtet sich gegen die eigenen Körperzellen. Das führt zum Auftreten von "Autoimmunerkrankungen", z.B. zu rheumatoider Arthritis, Morbus Bechterew, Sjögren-Syndrom, Colitis ulcerosa, u.a. Einer der wesentlichen Orte der Kooperation zwischen Antigen-aktivierten T-Zellen und anderen Zellen des Immunsystems sind die sekundären lymphatischen Organe, darunter die Tonsillen. Hier werden die T-Lymphozyten durch das von dendritischen Zellen präsentierte Antigen aktiviert, hier interagieren T-Lymphozyten mit B-Zellen. Aufgrund dieser Interaktion sezernieren B-Zellen nach mehreren Zwischenstufen der Differenzierung Antigen-spezifische Antikörper vom IgM- und IgG-Typ.

Das am besten charakterisierte und bisher mit wirksamste ko-stimulatorische Molekül ist das CD28-Oberflächenmolekül (nachstehend CD28-Rezeptor oder CD28 genannt), das auf einem großen Teil der T-Zellen konstitutiv exprimiert wird. *In vitro* führt die Ko-Stimulation durch CD28 nach Erkennung des Antigens durch den T-Zell-Rezeptor zu einer sehr starken Erhöhung der Zytokin-Sekretion von z.B. IL-2 und IFN- γ wie auch zu einer deutlichen Heraufregulation der Expression von Zelloberflächen-Molekülen wie CD25, CD69, CD71, welche für die Interaktion der T-Zellen mit anderen Immunzellen, z.B. B-Lymphozyten, notwendig sind; vgl. Chambers und Allison, *Current Opinion in Immunology* 9 (1997), 396-404. Durch die Ko-Stimulation über den CD28-Rezeptor läßt sich des weiteren die Proliferation der T-Lymphozyten deutlich steigern. Auch wird durch die Ko-Stimulation über den CD28-Rezeptor die T-Zell-Steuerung der B-Lymphozyten-Funktion so optimiert, daß es zu einer erhöhten Sekretion von Antikörpern kommt

Wenn die Funktion des CD28-Rezeptors aufgehoben wird, kommt es zu einer drastischen Funktionseinbuße der Immunabwehr. Das konnte anhand einer transgenen Maus gezeigt werden, in der das CD28-Gen durch homologe Rekombination zerstört wurde (ein sogenannter "CD28-knock-out"). Die auf diese Weise gestörte Aktivierung der Antigen-spezifischen T-Zellen führt zu einer fehlenden Ko-Stimulation. Diese wiederum führt zu einer Störung der T-Zell-Funktion, d.h. zu einer verminderten Proliferation der T-Zellen und zu einer drastisch verminderten Synthese verschiedener Zytokine. Die fehlende Ko-Stimulation führt letztendlich zu einer verminderten Funktion der Antigen-spezifischen Immunabwehr. So wird u.a. durch das Fehlen von CD28 die Bildung Antigen-spezifischer IgG1- und IgG2-Antikörper durch B-Lymphozyten auf 10% des Normwertes reduziert; vgl. Shahinian et al., *Science* 262 (1993), 609-612; Lucas et al. *Journal of Immunology* 154 (1995), 5757-5768.

Über eine Ko-Stimulation durch CD28 kann man *in vitro* auch das Eindringen des Aids-Virus in T-Lymphozyten verhindern; vgl. Riley et al., *Journal of Immunology* 158 (1997), 5545-5553. Entsprechende Versuche sind *in vivo* noch nicht durchgeführt worden. Bekanntlich schaltet CD28 viele Zytokin-Gene an, die *in vivo* zu erheblichen Nebenwirkungen führen können. Die Blockade der Rezeptoren von CD28 durch ein lösliches CTLA-4-Immunglobulin-Molekül ist in Affenmodell erfolgreich eingesetzt worden, um die Abstoßung von transplantierten Nieren zu verhindern. Hierbei wurde CTLA-4 in Kombination mit einem Antikörper gegen das CD40-Liganden-Molekül eingesetzt worden; vgl. Kirk et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 8789-8794. Die Blockade der CD28-Rezeptoren betrifft jedoch sämtliche T-Lymphozyten und nicht nur die bereits aktivierten, da CD28 auf T-Lymphozyten konstitutiv exprimiert wird.

Es besteht somit ein Bedarf an einem ko-stimulierenden Oberflächenmolekül, das nur auf aktivierten T-Lymphozyten exprimiert wird. Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Oberflächenmolekül auf aktivierten T-Zellen, das eine starke ko-stimulatorische Wirkung auf zentrale Funktionen der T-Lymphozyten aufweist, bereitzustellen. Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, Substanzen, z.B. monoklonale Antikörper gegen das ko-stimulatorische Oberflächenmolekül, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten des Oberflächenmoleküls bereitzustellen.

In einer ersten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen, charakterisiert dadurch, daß a) das Polypeptid auf

B
y

aktivierten CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten, aber nicht auf ruhenden oder aktivierten B-Zellen, Granulozyten, Monozyten, NK-Zellen (natürliche Killerzellen) oder dendritischen Zellen vorkommt, und b) das Polypeptid ein Dimer ist, wobei das Polypeptid ein Molekulargewicht von etwa 55 bis 60 kDa (Kilodalton) hat, bestimmt in einer nicht reduzierenden Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE), und wobei die zwei Polypeptidketten des Polypeptids ein Molekulargewicht von etwa 27 kDa und etwa 29 kDa haben, gemessen in einer reduzierenden SDS-PAGE.

Das erfindungsgemäße Polypeptid (nachstehend auch 8F4-Molekül oder 8F4 genannt) wird erst nach Aktivierung der T-Lymphozyten exprimiert, und zwar sowohl auf CD4⁺- wie auch auf CD8⁺-T-Zellen. In einer nicht reduzierenden SDS-PAGE weist das 8F4-Molekül ein Molekulargewicht zwischen etwa 55 und 60 kDa (Kilodalton) auf. Das 8F4-Molekül ist aus zwei Peptidketten zusammengesetzt, wobei die beiden Peptidketten in einer reduzierenden SDS-PAGE ein Molekulargewicht von etwa 27 und etwa 29 kDa aufweisen. Histologisch kann man das 8F4-Antigen auf aktivierten T-Lymphozyten im lymphatischen Gewebe der Tonsillen und Lymphknoten eindeutig nachweisen, insbesondere in Keimzentren, dem Ort der Interaktion von T-Lymphozyten und B-Lymphozyten bei der Generierung von Antikörpern. *Ex vivo* isolierte tonsilläre T-Zellen sind zu etwa 50-80% positiv für das 8F4-Antigen und weisen Zeichen einer fortgeschrittenen Aktivierung auf. Das 8F4-Molekül ist auf ruhenden oder aktivierten B-Zellen, Granulozyten, Monozyten, NK-Zellen und dendritischen Zellen nicht nachweisbar.

Eine wichtige biologische Aktivität des 8F4-Moleküls ist seine ko-stimulierende Aktivität von T-Lymphozyten. Die ko-stimulierende Aktivität kann bestimmt werden nach Linsley, et al., *Journal of Experimental Medicine* 176 (1992), 1595-604. Die ko-stimulierende Aktivität des 8F4-Moleküls ähnelt der ko-stimulierenden Aktivität des CD28-Moleküls, welches als zentrales Verstärkungselement der Antigen-Erkennung durch das Immunsystem identifiziert worden ist. Das 8F4-Molekül unterscheidet sich jedoch in vielen Aspekten von CD28. So muß die Expression des 8F4-Moleküls auf der Oberfläche der T-Zellen erst induziert werden, während CD28 konstitutiv exprimiert wird. Auch in der Funktion sind deutliche Unterschiede nachweisbar: Die Ko-Stimulation über CD28 führt zur Überexpression zahlreicher Lymphokine, u.a. des Interleukin-2 (IL-2). Auch die Ko-Stimulation über 8F4 führt zu einer verstärkten Sekretion von Lymphokinen, nicht jedoch des IL-2. Somit unterscheidet sich die ko-stimulatorische Aktivität des 8F4-Moleküls von der Aktivität des CD28-Moleküls. Da die Stimulation über 8F4 nicht alle Zytokin-Gene anschaltet, ist eine Ko-Stimulation über 8F4 *in vivo* vorteilhaft, z.B. gegenüber

B5

einer Ko-Stimulation über den CD28-Rezeptor. Auch unterscheidet sich die Induktion, die Expression, der Expressionsort und die Funktion des 8F4-Moleküls von allen anderen bekannten ko-stimulatorisch wirksamen Molekülen.

- 5 Bei dem erfindungsgemäßen 8F4-Molekül handelt es sich um ein neues Oberflächenmolekül auf aktivierten T-Zellen, das eine starke ko-stimulatorische Wirkung auf zentrale Funktionen der T-Lymphozyten aufweist. Die Expression *in vivo* deutet u.a. auf eine wesentliche Beteiligung des 8F4-Moleküls an der Kooperation von T-Zellen mit anderen Zellen des Immunsystems wie B-Zellen oder dendritischen Zellen im Rahmen der humoralen und zellulären Immunabwehr gegen
- 10 Viren und Bakterien hin.

Nach Expression hat das 8F4-Molekül *in vitro* eine starke ko-stimulatorische Wirkung auf verschiedene Funktionen der T-Lymphozyten:

- 15 1. Deutliche Verstärkung der Proliferation von T-Lymphozyten.
2. Deutliche Verstärkung der Synthese bestimmter Zytokine durch die T-Lymphozyten.
3. Stark erhöhte Expression von Steuerungs-Molekülen, z.B. Oberflächenmoleküle und Zytokine, auf und in T-Lymphozyten.
4. Deutliche Verbesserung der T-Zell-induzierten Antikörper-Bildung (IgM und IgG) durch B-
- 20 Zellen

In einer zweiten Ausführungsform betrifft die Erfindung monoklonale Antikörper gegen das 8F4-Molekül. Die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper können auf übliche Weise nach dem von Milstein und Köhler, *Nature* 256 (1975), 495-497, beschriebenen Verfahren hergestellt werden. Insbesondere können die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper hergestellt werden, indem Mäuse mit T-Zellen, die *in vitro* mit Phorbolmyristatacetat (PMA) und Ionomycin ("2-Signal-System") für 24 h aktiviert worden sind, immunisiert werden. Die Milzzellen der immunisierten Mäuse werden mit Myelom-Zellen fusioniert. 8F4-spezifische monoklonale Antikörper werden dadurch identifiziert, daß sie 2-Signal-aktivierte, jedoch nicht ruhende T-

30 Lymphozyten erkennen. Auch färben 8F4-spezifischen Antikörper mit einem Signal (entweder PMA oder Ionomycin) stimulierte T-Zellen in einem auf übliche Weise durchgeführten Nachweisverfahren nicht an. 8F4-spezifische Antikörper ergeben ein typisches Anfärbemuster von tonsillären T-Zellen und erkennen ein Antigen von etwa 55 bis 60 kDa in einer nicht reduzierenden SDS-PAGE und von etwa 27 kDa und etwa 29 kDa in einer reduzierenden SDS-

PAGE auf aktivierten T-Lymphozyten.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Hybridomzellen, die die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper herstellen.

5 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung die Verwendung von Substanzen, die die biologische Aktivität des erfindungsgemäßen Polypeptids 8F4 hemmen, als Arzneimittel. Besonders bevorzugt ist Verwendung der erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper, natürlicher oder synthetischer Liganden, Agonisten oder Antagonisten des 8F4-Moleküls. Diese
10 Substanzen können als Arzneimittel verwendet werden, zur Vorbeugung oder Therapie von Erkrankungen an denen das Immunsystem beteiligt ist, insbesondere zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten oder zur Verhinderung der Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen. Die Blockade der Interaktion des 8F4-Antigens mit seinem Rezeptor verbessert z.B. die Verhinderung der Organabstoßung, da eine solche Blockade nur bereits
15 aktivierte T-Lymphozyten betrifft.

3
2 Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft die Verwendung des erfindungsgemäßen Polypeptids als Arzneimittel. Insbesondere kann das erfindungsgemäße Polypeptid, zur Vorbeugung oder Therapie von Erkrankungen an denen das Immunsystem beteiligt ist, insbesondere zur Behandlung von Krebserkrankungen, Aids, Asthmaerkrankungen oder
20 chronischen viralen Erkrankungen wie HCV-oder HBV-Infektionen verwendet werden.

Das erfindungsgemäße Polypeptid kann ebenfalls auf übliche Weise in Zellen eingeführt werden, so daß diese Zellen das Polypeptid z.B. konstitutiv exprimieren. Z.B. kann die das Polypeptid
25 codierende Nukleinsäuresequenz oder ein Vektor, umfassend die das Polypeptid codierende Nukleinsäuresequenz, z.B. die cDNA oder genomische DNA, Promotoren, Enhancer und andere für die Expression der Nukleinsäuresequenz benötigten Elemente, in eine Zelle eingeschleust werden. Ferner kann das erfindungsgemäße Polypeptid z.B. mittels Liposomen in Zellen eingeführt werden, die das Polypeptid danach auf ihrer Zelloberfläche ausbilden.
30 Erfindungsgemäß können diese Zellen als Arzneimittel verwendet werden, insbesondere zur Wiederherstellung der Dysregulation des menschlichen Immunsystems, wie sie im Rahmen zahlreicher chronischer Infektionserkrankungen auftritt, z.B. im Rahmen von AIDS, Asthmaerkrankungen oder bei chronischen viralen Hepatitiden (z.B. HCV, HBV), oder zur Stimulation des Immunsystems *in vitro* oder *in vivo*, wie z.B. für die Therapie von

Kreberkrankungen verwendet werden.

In einer weiteren Ausführungsform werden Substanzen, die das erfindungsgemäße Polypeptid spezifisch erkennen, zur Diagnose von Erkrankungen, an denen das Immunsystem beteiligt ist verwendet, wobei die Substanzen insbesondere einen monoklonalen Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten umfassen. Zur Diagnose kann z.B. ein ELISA-Nachweis, Durchflußzytometrie, Western Blot, Radioimmunassay, Nephelometrie oder eine histochemische Anfärbung verwendet werden. Die Durchführung dieser Nachweise sind dem Fachmann bekannt.

10

Die Abbildungen dienen der Erläuterung der Erfindung:

Fig. 1 zeigt das Ergebnis einer Immunpräzipitation des 8F4-Antigens aus aktivierten humanen T-Zellen. (a) Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE; 12% Polyacrylamidgel (PAA-Gel)) reduzierend; (b) SDS-PAGE (10% PAA-Gel) nicht reduzierend. Angegeben sind die Bedingungen zur Elution des Antigens von der 8F4-Matrix. "SDS" bedeutet Natriumdodecylsulfat; "DTT" bedeutet Dithiothreitol, "Mr" bedeutet Molekulargewicht und "kDa" bedeutet Kilodalton.

Fig. 2a zeigt das Ergebnis einer Durchflußzytometrie nach Induktion des 8F4-Antigens auf CD4⁺-T-Zellen. Die Aktivierungsdauer der T-Zellen ist in Klammern angegeben. "PMA" bedeutet Phorbolmyristataacetat; "PHA" bedeutet Phytohaemagglutinin; "OKT3" ist ein monoklonaler Antikörper gegen CD3; "MLR" bedeutet gemischte Lymphocytenreaktion (engl.: *mixed lymphocyte reaction*); "mAK 9.3" ist ein monoklonaler Antikörper gegen CD28; "SEB" bedeutet Staphylokokken Enterotoxin B.

Fig. 2b zeigt das Ergebnis einer Kinetik der Induktion des 8F4-Antigens auf CD4⁺-T-Zellen nach Aktivierung mit PMA und Ionomycin in einer Durchflußzytometrie. Aufgetragen ist die Immunfluoreszenz (log) gegen die Zellzahl

30

Fig. 3 zeigt das Ergebnis einer Durchflußzytometrie zur Identifikation von Molekülen, welche an der Induktion von 8F4 in der "mixed lymphocyte reaction" beteiligt sind. "bio" bedeutet biotinylierter Antikörper.

Fig. 4 zeigt das Ergebnis einer histochemischen Untersuchung zur Lokalisation von 8F4-positiven Zellen in der Tonsille.

Fig. 5 zeigt das Ergebnis einer Expressions-Analyse von 8F4 auf T- und B-Zellen aus humanen Tonsillen in einer Durchflußzytometrie. "bioPE" bedeutet biotinylierter Antikörper und Streptavidin-Phycoerythrin Sekundärreagenz.

Fig. 6 zeigt die Ko-Expression des 8F4-Moleküls mit anderen Aktivierungsmarkern (CD69, CD45) in einer Durchflußzytometrie.

Fig. 7 zeigt schematisch die verstärkte Expression von Aktivierungsmolekülen auf T-Lymphozyten nach Ko-Stimulation durch 8F4. Offene Kreise (O) stehen für 8F4 Antikörper; Dreiecke (◆) stehen für unspezifischer Antikörper gleichen Isotyps; ausgefüllte Kreise (●) stehen für anti-CD28-Antikörper-9.3.

Fig. 8 zeigt einen schematischen Vergleich der ko-stimulierenden Wirkung von 8F4 mit der ko-stimulierenden Wirkung von CD28. "mAk" bedeutet monoklonaler Antikörper; "ATAC" bedeutet "Activation induced T cell derived And Chemokine related"; "cpm" bedeutet radioaktive Zerfälle pro Minute.

Fig. 9 zeigt schematisch die Verstärkung der Synthese der Antikörper vom IgM- und IgG-Typ durch die B-Zellen nach Ko-Stimulation von T-Zellen. "ng" bedeutet Nannogramm; "ml" bedeutet Milliliter; "mAk" bedeutet monoklonaler Antikörper.

Fig. 10 zeigt schematisch die Verhinderung der aktivierungsinduzierten Apoptose peripherer T-Zellen nach Ko-Stimulation durch 8F4.

Die nachstehenden Beispiele erläutern die Erfindung und sind nicht einschränkend zu verstehen.

Beispiel 1: Generierung des 8F4-Antikörpers

Balb/c Mäuse wurden mit humanen T-Zellen immunisiert, welche vorher für 24 h mit 33 ng/ml des Phorbolesters Phorbolmyristataacetat (PMA), (Sigma, Deisenhofen), und mit 200 ng/ml der Ca^{2+} -Ionophore Ionomycin (Sigma, Deisenhofen) aktiviert worden sind (sogenannte "2-Signal-

Aktivierung"). Nach dreimaligem Boostern wurden die Milzzellen der Mäuse mit dem Myelom P3X63Ag8.653 (ATCC Nr.CRL-1580) fusioniert und Antikörper-sezernierende Hybridome nach Standardmethoden generiert; vgl. Peters und Baumgarten, Monoclonal Antibodies. Springer, Heidelberg, 1992. Das Durchmustern der erhaltenen Antikörper erfolgte auf aktivierten versus ruhenden T-Zellen in der Durchflußzytometrie. Aktivierte ("2-Signal-Aktivierung") und ruhende T-Zellen wurden mit dem Hybridomüberstand inkubiert und anschließend mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper markiert; vgl. Shapiro, Practical Flow Cytometry. Wiley-Liss, New York, 1995. Nur die Antikörper, welche Moleküle erkannten, die ausschließlich durch PMA und die Ca^{2+} -Ionophore Ionomycin auf der T-Zell-Oberfläche induziert wurden, jedoch nicht durch eines der Agenzien alleine ("2-Signal-Moleküle") wurden für eine weitere Reinigung ausgewählt. Die erhaltenen Antikörper wurden in der Durchflußzytometrie auf Ähnlichkeit bzw. Verschiedenheit zu bekannten Antikörpern gegen Aktivierungsmoleküle (vgl. Tabelle 1) auf T-Zellen untersucht. Kriterien waren hierbei neben der schon oben erwähnten "2 Signal-Abhängigkeit" die Kinetik der Induktion auf stimulierten T-Zellen und die Expression auf verschiedenen Zelllinien.

Beispiel 2: Immunpräzipitation des 8F4-Antigens

Oberflächenmoleküle von aktivierten humanen T-Zellen wurden mit ^{125}I nach Standardmethoden iodiniert und mit dem Antikörper 8F4 nach Standardmethoden immunpräzipitiert; vgl. Goding, Monoclonal Antibodies: Principle and Practice. Academic Press, London, 1996. Für die Immunpräzipitation wurde der Antikörper nach Schneider et al., *Journal of Biological Chemistry* 257 (1982), 10766-10769, an Protein G (Pharmacia, Freiburg) gekoppelt (8F4-Matrix). Das Waschen der Matrix erfolgte nach Schneider et al., siehe vorstehend. Das immunpräzipitierte 8F4-Molekül wurde auf übliche Weise in der SDS-PAGE (nicht reduziert und reduziert) auf seine molekulare Masse analysiert; Goding, siehe vorstehend.

Beispiel 3. Durchflußzytometrie

Die Analyse der 8F4-tragenden T-Zellen in der Durchflußzytometrie erfolgte nach Standardmethoden; vgl. Shapiro, Practical Flow Cytometry. Wiley-Liss, New York, 1995.

Ausführungsbeispiel 3.1: Durchflußzytometrie nach Induktion des 8F4-Antigens auf CD4^+ -T-Zellen.

CD4⁺-T-Zellen aus dem peripheren Blut wurden mit verschiedenen Agenzien in üblicher Weise stimuliert und auf Expression des 8F4-Moleküls in der Durchflußzytometrie nach üblichem Verfahren untersucht. Die Aktivierungsdauer der T-Zellen betrug mit den verschiedenen Agenzien zwischen 24 Stunden und 144 Stunden. Aktivierungsmodi: Phorbolmyristatacetat (PMA; 33 ng/ml), Ionomycin (200 ng/ml), Phytohaemagglutinin (PHA 1,5 mg/ml), OKT3 (monoklonaler Antikörper gegen CD3), gemischte Lymphocytenreaktion (MLR, "mixed lymphocyte reaction" zwischen 50 000 CD4⁺-T-Zellen und 100 000 B-Zellen), mAk 9.3 (monoklonaler Antikörper gegen CD28), Staphylokokken Enterotoxin B (SEB, 0,1 ng/ml). Die Auswertung ergab, daß verschiedene Stimuli geeignet sind, das 8F4-Molekül auf T-Zellen zu induzieren, jedoch in unterschiedlicher Expressionsdichte. Am potentesten sind neben den stark wirksamen pharmakologischen Agenzien PMA und Ionomycin solche Stimuli, die eine ko-stimulatorische Situation darstellen, wie z.B. akzessorische Zellen in der MLR oder der ko-stimulierende mAk 9.3.

Ausführungsbeispiel 3.2: Kinetik der Induktion des 8F4-Antigens auf CD4⁺-T-Zellen nach Aktivierung mit PMA und Ionomycin.

CD4⁺-T-Zellen aus dem peripheren Blut wurden mit PMA (33 ng/ml) und Ionomycin (200 ng/ml) in üblicher Weise stimuliert und nach 0, 4, 8, 12, 24 und 48 Stunden auf die Expression des 8F4-Moleküls in der Durchflußzytometrie in üblicher Weise untersucht. Das Molekül ist bereits nach vier Stunden auf der Oberfläche detektierbar, gehört also zur Klasse der relativ frühen Aktivierungsantigene. Auch nach 48 Stunden wird das Antigen noch gut exprimiert.

Ausführungsbeispiel 3.3: Durchflußzytometrie zur Identifikation von Molekülen, welche an der Induktion von 8F4 in der "mixed lymphocyte reaction" beteiligt sind.

50 000 CD4⁺-T-Zellen aus dem peripheren Blut wurden mit 100 000 allogenen tonsillären B-Zellen für 6 Tage ko-kultiviert (37°C, 5,2% CO₂, 200 µl RPMI 1640 mit 10% FCS in 96-Well-Rundbodenplatten) und danach auf die Expression des 8F4-Moleküls in der Durchflußzytometrie untersucht. Zu Beginn der Kultivierung wurden verschiedene Antikörper (anti-CD80, anti-CD86, anti-MHCII; alle 10 mg/ml) der Kultur hinzugefügt, um die Abhängigkeit der 8F4-Induktion von diesen Molekülen zu überprüfen. Die Expression von 8F4 läßt sich nur durch Blockade der CD86/CD28-Interaktion blockieren, nicht jedoch durch Blockade von CD80. Der Blockade-

Effekt ist hierbei noch stärker als die Blockade von MHCII (Positivkontrolle).

Ausführungsbeispiel 3.4: Expression von 8F4 auf T- und B-Zellen aus humanen Tonsillen.

- 5 B-Zellen bzw. T-Zellen aus tonsillärem Gewebe von verschiedenen Quellen wurden auf übliche Weise gereinigt und in der Durchflußzytometrie auf die Expression des 8F4-Moleküls untersucht. Während auf B-Zellen das Signal nicht eindeutig signifikant war, exprimierten etwa 50-80% der tonsillären T-Zellen das 8F4-Molekül in unterschiedlicher Dichte. Es lassen sich hierbei zwei Populationen unterschiedlich hoher Fluoreszenz (8F4-"high" bzw. -"low") erkennen, deren
- 10 Ausprägung bei den verschiedenen Tonsillen unterschiedlich ist. So weist z.B. Tonsillen eine ausgeprägte 8F4-"low"- und andere Tonsillen eine ausgeprägte 8F4-"high"-Population auf.

Ausführungsbeispiel 3.5: Ko-Expression des 8F4-Moleküls mit anderen Aktivierungsmarkern.

- 15 Aus humanen Tonsillen gereinigte T-Zellen wurden in der 2-Farben-Durchflußzytometrie auf die Ko-Expression des 8F4-Moleküls mit anderen Aktivierungsmarkern analysiert. In Tonsillen wird 8F4 ko-exprimiert mit CD69 wie auch mit Varianten des CD45-Moleküls. Hierbei sind die 8F4-"high"-Zellen eindeutig mit einer CD45RO-Expression korreliert, während die 8F4-negativen Zellen den Phänotyp CD45RA tragen. CD45RA wird hauptsächlich von sogenannten "naiven" T-
- 20 Zellen exprimiert, wohingegen CD45RO mit einer Effektorzellfunktion assoziiert ist. Es handelt sich also bei den 8F4⁺-Zellen hauptsächlich um "reife" T-Zellen. CD45RO und CD45RA sind Isoformen von CD45.

Beispiel 4: Lokalisation von 8F4-positiven Zellen in der Tonsille

- 25 Tonsilläres Gewebe in Gefrierschnitten wurde mit dem 8F4-Antikörper in der APAAP-Technik (alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase) nach Standardverfahren angefärbt. 8F4⁺-Zellen wurden vorzugsweise im Keimzentrum der Tonsillen vorgefunden, aber z. T. auch in der T-Zell-Zone der Tonsillen.

30

Beispiel 5: Ko-Stimulation von T-Lymphozyten

96-Well-Platten wurden mit einem Ziegen-anti-Maus-Ig-Antikörper beschichtet (20 µg/ml), gewaschen, und mit dem anti-CD3 monoklonalen Antikörper OKT3 (verschiedene Verdünnungen

eines Aszites) und dem erfindungsgemäßen 8F4-Antikörper (2 mg/ml) beladen. Als Isotypkontrolle wurden der OKM1 Antikörper oder der 2A11 Antikörper (beide 2 mg/ml) verwendet.

5 Ausführungsbeispiel 5.1: Verstärkte Expression von Aktivierungsmolekülen auf T-Lymphozyten nach Ko-Stimulation durch 8F4.

Gereinigte CD4⁺-T-Zellen aus dem peripheren Blut wurden mit verschiedenen Konzentrationen des monoklonalen Antikörpers OKT3 aktiviert und gleichzeitig mit dem 8F4-Antikörper oder
10 einem unspezifischen Antikörper gleichen Isotyps ko-stimuliert. Als Vergleich wurde die Kostimulation mit dem anti-CD28-Antikörper-9.3, einem der stärksten bekannten ko-stimulatorischen Antikörper, durchgeführt. Selbst bei optimaler Stimulation über CD3 ist sowohl
} mit dem mAk 8F4 als auch mit mAk 9.3 noch ein ko-stimulatorischer Effekt zu sehen. Im suboptimalen OKT3-Bereich, d.h. dem Bereich, in dem ohne Ko-Stimulation keine volle T-
15 Zellaktivierung mehr erzielt werden kann, können beide Antikörper die Expression anderer Aktivierungsantigene um den Faktor 4 bis 100 steigern, wobei die Wirkung des anti-CD28-Antikörpers auch noch bei sehr hohen OKT3-Verdünnungen sichtbar wird. Dies ist darauf zurückzuführen, daß bei sehr schwacher OKT3-Stimulation das 8F4-Antigen nicht mehr auf die Zelloberfläche gebracht und somit auch nicht vom mAk 8F4 kreuzvernetzt werden kann.

20 Ausführungsbeispiel 5.2: Vergleich der ko-stimulierenden Wirkung von 8F4 mit der ko-stimulierenden Wirkung von CD28.

Gereinigte CD8⁺-T-Zellen wurden für 51 h mit einer suboptimalen Konzentration des
25 monoklonalen Antikörpers OKT3 stimuliert. Als Ko-Stimulatoren wurden Antikörper 8F4, Antikörper 9.3 (anti-CD28) und Isotypkontrollen eingesetzt (jeweils 2 mg/ml). Nach Ablauf der Stimulationsdauer wurde die Proliferationsrate der T-Zellen durch ³H-Thymidin-Einbau bestimmt. In Parallelkulturen wurde der Überstand entfernt und die Konzentration der Zytokine ATAC/Lymphotoctin und IL-2 bestimmt. Bezüglich der IL-2-Synthese unterscheiden sich 8F4
30 und CD28 sehr stark voneinander. CD28-Ko-Stimulation führt, wie auch im Stand der Technik beschrieben (Chambers und Allison, *Current Opinion in Immunology* 9 (1997), 396-404), zu einer sehr starken IL-2 Sekretion. Mit 8F4 hingegen liegt die IL-2 Produktion unterhalb der Nachweisgrenze. Die Proliferation ist jedoch in beiden Ansätzen vergleichbar, das autokrine Wachstum der T-Zellen muß also bei 8F4-Ko-Stimulation auf andere Faktoren zurückgeführt

werden. Auch in bezug auf die Sekretion des Lymphokins ATAC unterscheiden sich die beiden Antikörper in der ko-stimulatorischen Wirkung kaum.

Beispiel 6: Bestimmung der von B-Zellen synthetisierten Immunglobuline nach Interaktion mit 8F4 ko-stimulierten T-Zellen

96-Well-Platten wurden mit einem Ziegen-anti-Maus-Ig-Antikörper beschichtet (20 mg/ml), gewaschen, und mit dem anti-CD3 monoklonalen Antikörper OKT 3 (1:500 bis 1:80 000 Aszites) und dem erfindungsgemäßen 8F4-Antikörper (2 mg/ml) beladen. Als Isotypkontrolle wurde der OKM1-Antikörper oder der 2A11-Antikörper verwendet. In einigen Experimenten wurde zum Vergleich eine Ko-Stimulation mit einem CD28-spezifischen Antikörper ("9.3") durchgeführt; vgl. Hara et al., *Journal of Experimental Medicine* 161 (1985), 1513-1524. In die so vorbehandelten Kulturplatten wurden pro well 50 000 gereinigte (Magnetobeads, Dynal, Hamburg) CD4⁺-T-Zellen (>95% Reinheit) aus dem peripheren Blut und 25 000 allogene tonsilläre B-Zellen (negativ-Selektion durch T-Zell-Rosettierung mit Schafserythrocyten, 96% Reinheit) pipettiert und für 8 Tage ko-kultiviert. Nach dieser Zeitdauer wurde der Überstand entnommen und auf die Konzentration sezernierter Immunglobuline vom IgM- und IgG-Typ im ELISA auf übliche Weise analysiert; vgl. Nishioka and Lipsky, *Journal of Immunology* 153 (1994), 1027-1036.

Ausführungsbeispiel 6.1: Verstärkung der Synthese der Antikörper vom IgM- und IgG-Typ durch die B-Zellen nach Ko-Stimulation von T-Zellen.

Gereinigte CD4⁺-T-Zellen aus dem peripheren Blut wurden für 8 Tage mit allogenen B-Zellen aus Tonsillen in üblicher Weise ko-kultiviert. Bei einer suboptimalen Stimulation der T-Zellen mit dem OKT3-Antikörper verstärkt die Ko-Stimulation der T-Zellen durch 8F4 die Sekretion der IgM- und IgG-Immunglobuline um den Faktor 40.

Beispiel 7: Verhinderung der aktivierungsinduzierten Apoptose peripherer T-Zellen nach Ko-Stimulation durch 8F4.

Periphere T-Zellen (über Nylonwolladhärenz in üblicher Weise aufgereinigt) wurden für 20 h mit PHA (1.5 mg/ml) stimuliert und über 6 Tage mit IL-2 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durch OKT3 mit und ohne Ko-Stimulation durch mAk 8F4 (2 mg/ml) restimuliert. Die Apoptose wurde durch Anfärbung der DNA mit Propidiumiodid in der Durchflußzytometrie (FACS)

B14

bestimmt. Bei suboptimaler Stimulation über den T-Zellrezeptor-Komplex kann Ko-Stimulation über 8F4 den Anteil apoptotischer Zellen um den Faktor 4 senken.

Tab.1:

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die verwendeten Antikörper (Klon), deren Herkunftsquelle (Quelle), die Spezifität gegen ihr jeweiliges Antigen (Spezifität) und gegebenenfalls ihre Markierung (Label) wider.

| Spezifität | Label | Isotyp | Klon | Quelle |
|-------------|-----------|--------|---------|------------------------------|
| CD3 | Cy-Chrome | IgG1 | UCHT1 | Pharmingen, Hamburg |
| CD3 | - | IgG2a | OKT3 | ATCC CRL-8001 |
| CD11b | - | IgG2b | OKM1 | ATCC CRL-8026 |
| CD25 | FITC | IgG2a | B1.49.9 | Immunotech, Hamburg |
| CD28 | - | IgG2a | 9.3 | Immunex Corp., Seattle, USA |
| CD45RA | Cy-Chrome | IgG2b | HI100 | Pharmingen, Hamburg |
| CD45RO | FITC | IgG2a | UCHL1 | Immunotech, Hamburg |
| CD69 | FITC | IgG1 | FN50 | Pharmingen, Hamburg |
| CD80 | - | IgG1 | L307.4 | Becton Dickinson, Heidelberg |
| CD86 | - | IgG2b | IT2.2 | Pharmingen, Hamburg |
| CD154 | FITC | IgG1 | TRAP-1 | Hybridom ¹ |
| MHCII | - | IgG2a | L243 | ATCC HB-55 |
| 8F4 | - | IgG1 | 8F4 | Hybridom ¹ |
| 8F4 | Biotin | IgG1 | 8F4 | Hybridom ¹ |
| Isotyp IgG1 | - | IgG1 | 2A11 | Hybridom ^{1,2} |
| Isotyp IgG1 | FITC | IgG1 | 2A11 | Hybridom ^{1,2} |
| Isotyp IgG1 | Biotin | IgG1 | ASA-1 | Hybridom ¹ |

¹ Die Hybridomzelllinie wurde auf übliche Weise generiert, der Antikörper aufgereinigt und gegebenenfalls markiert.

² gerichtet gegen ein synthetisches Peptid

Die in den Beispielen verwendeten Antiseren und Sekundärreagenzien wurden bezogen von:
 Ziege-anti-Maus-Ig, FITC-konjugiert, von Jackson Immuno Research Lab., USA; Streptavidin, PE-konjugiert, von Jackson Immuno Research Lab., USA; Kaninchen-anti-Maus-Ig-Fraktion, von Sigma, Deisenhofen.

B
15

Patentansprüche

1. Ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen, dadurch charakterisiert, daß
 - a) das Polypeptid auf aktivierten $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Lymphozyten, aber nicht auf ruhenden oder aktivierten B-Zellen, Granulozyten, Monozyten, NK-Zellen oder dendritischen Zellen vorkommt, und
 - b) das Polypeptid ein Dimer ist, wobei das Polypeptid ein Molekulargewicht von etwa 55 bis 60 kDa hat, bestimmt in einer nicht reduzierenden Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese, und wobei die zwei Polypeptidketten des Polypeptids ein Molekulargewicht von etwa 27 kDa und etwa 29 kDa haben, gemessen in einer reduzierenden Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese.
2. Monoklonaler Antikörper, der das Polypeptid nach Anspruch 1 spezifisch erkennt.
3. Monoklonaler Antikörper, der das Polypeptid nach Anspruch 1 spezifisch erkennt, dadurch gekennzeichnet, daß B-Zellen von Mäusen, die mit PMA und der Ca^{2+} -Ionophore Ionomycin aktivierten humanen T-Lymphozyten immunisiert werden, mit einer Myelomzelllinie zu einem Antikörper-sezernierenden Hybridom fusioniert werden und die monoklonalen Antikörper in der Durchflußzytometrie auf 2-Signal-Molekül-aktivierte gegen ruhende T-Zellen gereinigt werden.
4. Hybridomzelle, die den monoklonalen Antikörper nach Anspruch 2 oder 3 erzeugt.
5. Verwendung von Substanzen, die die biologische Aktivität des Polypeptids nach Anspruch 1 hemmen, als Arzneimittel.
6. Verwendung nach Anspruch 5, wobei die Substanzen einen monoklonalen Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten umfassen.
7. Verwendung von Substanzen, die die biologische Aktivität des Polypeptids nach Anspruch 1 hemmen, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten oder zur Verhinderung der Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen.

B₁₆

8. Verwendung des Polypeptids nach Anspruch 1 als Arzneimittel
9. Verwendung des Polypeptids nach Anspruch 1 zur Herstellung von Arzneimitteln zur
5 Behandlung von Krebserkrankungen, Aids, Asthmaerkrankungen oder chronischen viralen
Erkrankungen wie HCV- oder HBV-Infektionen.
10. Verwendung von Zellen, enthaltend das Polypeptid nach Anspruch 1, als Arzneimittel
- 10 11. Verwendung von Zellen nach Anspruch 10 zur Herstellung eines Arzneimittels zur
Behandlung von Krebserkrankungen, Aids, Asthmaerkrankungen oder chronischen viralen
Erkrankungen wie HCV- oder HBV-Infektionen.
12. Verwendung von Substanzen, die das Polypeptid nach Anspruch 1 spezifisch erkennen,
15 zur Diagnose von Erkrankungen, an denen das Immunsystem beteiligt ist.
13. Verwendung nach Anspruch 12, wobei die Substanzen einen monoklonalen Antikörper,
natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten umfassen.
- 20 14. Verwendung nach Anspruch 12 oder 13, wobei zur Diagnose ein ELISA-Nachweis,
Durchflußzytometrie, Western Blot, Radioimmunassay, Nephelometrie oder eine histochemische
Anfärbung verwendet wird.

B
17

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Polypeptid (8F4-Molekül) mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen. Weiterhin betrifft die Erfindung monoklonale Antikörper gegen das 8F4-Molekül und Hybridomzellen, die die monoklonalen Antikörper herstellen. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung von Substanzen, die die biologische Aktivität des erfindungsgemäßen Polypeptids 8F4 hemmen, insbesondere monoklonale Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten, als Arzneimittel, insbesondere zur Vorbeugung oder Therapie von Erkrankungen an denen das Immunsystem beteiligt ist. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung des 8F4-Moleküls oder von Zellen, die das 8F4-Molekül enthalten, als Arzneimittel, insbesondere zur Vorbeugung oder Therapie von Erkrankungen an denen das Immunsystem beteiligt ist. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung von Substanzen, die das erfindungsgemäße Polypeptid spezifisch erkennen, insbesondere monoklonale Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten, zur Diagnose von Erkrankungen, an denen das Immunsystem beteiligt ist.